

## Взаимодействие олигокатионных производных *p*-трет-бутилтиакаликс[4]арена с биополимерами

Мостовая О.А.,\*<sup>а</sup> Попова Д.В.,<sup>а</sup> Пупламп Д.Б.,<sup>а</sup> Галухин А.В.,<sup>а</sup>  
Зуев Ю.Ф.,<sup>б</sup> Антипин И.С.,<sup>а</sup> Коновалов А.И.,<sup>а</sup> Стойков И.И.<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Химический институт им. А.М. Бутлерова, Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, ул. Кремлевская, д. 18, Казань. Факс: 843 275 2253; тел: 843 231 5462;

E-mail: olga.mostovaya@mail.ru

<sup>б</sup> Казанский институт биохимии и биофизики, 420111, ул. Лобачевского, д.2/31, Казань. Факс: 843 292 7347; тел: 843 292 7347

Синтезированы новые производные *p*-трет-бутилтиакаликс[4]арена, содержащие аммонийные и гуанидиновые группы. Спектральными методами (УФ, флуоресцентной спектроскопией, динамическим светорассеянием) установлено их взаимодействие с рядом модельных биополимеров (ДНК из молок лосося, тимуса телёнка, синтетическим олигонуклеотидом).

### Введение

Одной из важных задач современной химии является создание рецепторных структур на ДНК. Повышенный интерес к ним обусловлен важной проблемой современности: лечением наследственных и ген-зависимых заболеваний. В супрамолекулярной химии активно ведутся разработки по созданию рецепторов, способных к селективному связыванию биологически активных молекул, неспособных к транспорту через клеточную мембрану, что позволяет вводить в клетку лекарственные вещества и гидрофильные биомолекулы, такие как ДНК. В качестве таких рецепторов возможно использование функционализированных полярными группами каликс[4]аренов, имеющих гидрофобный макроциклический фрагмент. Так, на сегодняшний день получены разнообразные рецепторы на ДНК на каликсареновой платформе.<sup>1-3</sup> В качестве участков связывания предложены положительно заряженные аммонийные и гуанидиновые группы.<sup>1,2</sup> Однако в литературе на сегодняшний день не описаны рецепторы на тиакаликсареновой платформе, на основе которой возможно получение большого числа макроциклов с различно ориентированными в пространстве группами из-за большей конформационной подвижности данного соединения по сравнению с классическим каликсареном<sup>4</sup>.

### Результаты и обсуждение

В качестве потенциальных рецепторов на ДНК нами были выбраны олигоаминное **1** и гуанидиновое **2** производные тиакаликс[4]арена (схема 1). Для придания большего сродства к ДНК и увеличения растворимости в воде соединение **1** было переведено в аммонийную форму.

В качестве исследуемых биообъектов нами были выбраны коммерчески доступные ДНК – из молок лосося, тимуса телёнка. Кроме того, предварительные исследования проводились на синтетическом олигонуклеотиде известной

структуры, который является упрощённым аналогом ДНК.

Первоначально было изучено взаимодействие олигоаммонийного производного тиакаликсарена с биополимерами методом УФ спектроскопии. Хорошо известно, что при взаимодействии ДНК с рецепторами в результате упорядочения структуры наблюдается гипохромный эффект<sup>5</sup>. И, как правило, процесс агрегации сопровождается рассеянием света вследствие образования более крупных частиц, что проявляется подъёмом базовой линии. В случае наших исследований максимумы поглощения ДНК и рецептора совпадают (260 нм). В результате проведённых исследований было установлено наличие гипохромного эффекта, что свидетельствует о взаимодействии рецептора с изученными биополимерами. Аналогичные результаты были получены и для соединения **2**.

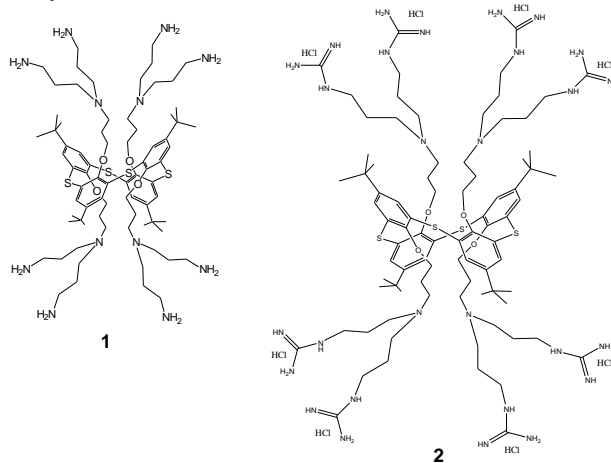


Схема 1. Олигокатионные производные *p*-трет-бутилтиакаликс[4]арена

Далее, для подтверждения взаимодействия между биомacroмолекулами и изучаемыми рецепторами, нами был применён метод флуоресцентной спектроскопии. Поскольку ни ДНК, ни каликсарен заметной флуоресценцией не обладают, в качестве флуоресцентной метки нами был выбран краситель –

этидийбромид, являющийся интеркалятором. При связывании с биомакромолекулой его флуоресценция значительно возрастает, поскольку уменьшается тушение, обусловленное молекулами воды и кислорода.<sup>6</sup>

При добавлении к раствору в буфере олигонуклеотида либо ДНК тиакликсарена **1** интенсивность люминесценции комплекса биополимера с интеркалятором уменьшается, со временем выходя на минимальное значение. Так, уже при концентрации рецептора 15 мкМ наблюдается заметное снижение эмиссии комплекса ДНК из тимуса телёнка с интеркалятором на 25%. В случае олигонуклеотида картина аналогична.

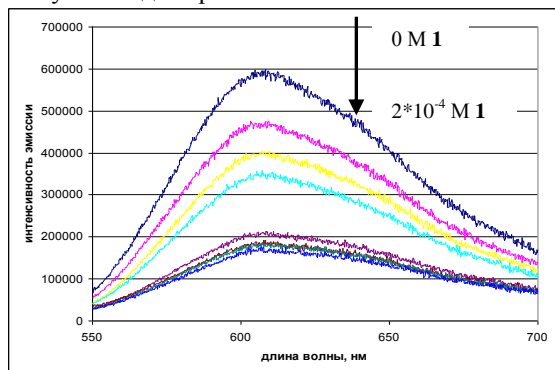


Рис. 1. Влияние рецептора **1** на флуоресценцию комплекса этидий бромид с олигонуклеотидом

Поскольку теоретически снижение интенсивности эмиссии может быть обусловлено комплексообразованием рецептора с красителем, нами был проведен эксперимент в отсутствие ДНК. Было установлено, что наличие рецептора не влияет на интенсивность флуоресценции красителя, что позволяет исключить данную причину. Аналогичные результаты получены и для гуанидинового производного **2**.

Однако оставалось неясным влияние макроциклов на флуоресценцию этидийбромида. Во-первых, возможно, что рецепторы связываются с биомолекулами, нейтрализуя отрицательный заряд на них, и тем самым препятствуют интеркаляции. Однако возможно и другое действие – макроцикл тушит флуоресценцию комплекса ДНК и этидийбромида. С целью установления этого влияния нами был проведен дополнительный эксперимент методом УФ спектроскопии в присутствии интеркалятора. Хорошо известно, что интенсивность поглощения интеркаляторов при связывании уменьшается, и наблюдается батохромный сдвиг.<sup>5</sup> Прибавление к исследуемой смеси тиакликсарена **2** приводит к уменьшению величины батохромного сдвига и гипохромного эффекта, что свидетельствует о том, что рецептор препятствует интеркаляции.

Дополнительно подтвердить наше предположение удалось с помощью измерения методом счёта единичных фотонов времён жизни этидийбромида в буфере, его же в присутствии ДНК и смеси интеркалятора, ДНК и рецептора **2**. Затухание флуоресценции этидийбромида в буфере подчиняется 1-экспоненциальному закону, что указывает на наличие одного типа флуорофора. При

добавлении ДНК из молок лосося затухание происходит по 2-экспоненциальному закону, что указывает на наличие в растворе двух типов флуорофоров: свободного (7%) и связанного (93%). Добавление же рецептора приводит к увеличению содержания свободной формы флуорофора до 30%, что однозначно указывает на то, что рецептор препятствует интеркаляции.

Таким образом, нами установлено наличие комплексообразования между макроциклами **1** и **2** и ДНК. Однако, помимо самого факта взаимодействия, очень важным является размер получаемых агрегатов.<sup>7</sup> Для определения этих параметров нами был использован метод динамического светорассеяния. Первоначально была изучена самоагрегация макроциклов. Установлено, что при концентрации  $6.25 \times 10^{-7} - 10^{-5}$  М макроциклы **1** и **2** образуют агрегаты размером 28 и 51 нм соответственно. ДНК в растворе находится в виде частиц размером порядка 12 нм, с очень высоким значением полидисперсности (порядка 0.6).

Прибавление макроциклов приводит к значительному снижению полидисперсности (до значений порядка 0.1-0.2). Размеры полученных агрегатов составляют 85 нм (для **1**) и 90 (для **2**).

Таким образом, в результате проведённого исследования установлена способность к агрегации с нуклеиновыми кислотами водорастворимых гуанидинового и аммонийного производных п-трет-бутилтиакаликс[4]арена.

## Экспериментальная часть

Спектры поглощения записывали на спектрометре PerkinElmer, толщина пропускающего слоя 1 см. Щели 1 нм. Использовались кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см.

Спектры флуоресценции регистрировали на люминесцентном спектрометре Fluorolog 3 (Horiba Jobin Yvon). Длина волны возбуждения была выбрана 500 нм, диапазон сканирования длин волн эмиссии - 550-700 нм. Щели возбуждения и испускания были выбраны по 3 нм. Использовались кварцевые кюветы с длиной оптического пути 2 мм. Корректировка спектров эмиссии проводилась автоматически (программой "Fluorescence"). В качестве флуоресцентной метки использовали этидийбромид. Времена жизни флуоресценции определялись методом счёта единичных фотонов, обработка результатов проводилась с использованием программы "Data Analysis Software v.6.3.2".

Самоагрегация рецепторов и их агрегация с ДНК из молок лосося были изучены на анализаторе размеров наночастиц Zetasizer Nano ZS (Malvern). Инструмент оснащён 4 мВ He-Ne-лазером, работающим на длине волны 633 нм. Измерения проводились при угле детектирования 173°, позиция измерения внутри полистирольных кювет определялась автоматически.

*Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы*

(№ n1107 от 26 августа 2009 г.), Российского фонда фундаментальных исследований (09-03-00426-а) и программы грантов Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - докторов наук (МД-2747.2010.3).

### **Библиографический список**

- 1 C.J. Breitkreuz, R. Zadmard, T. Schrader // *Supramolecular Chemistry*. **2008**. V. 20 (1–2). - P.109.
- 2 F. Sansone, M. Dudic, G. Donofrio, C. Rivetti, L. Baldini, A. Casnati, S. Cellai, R. Ungaro // *Journal of American Chemical Society*. **2006**. 128. – P. 14528.
- 3 A. Dondoni, A. Marra // *Chemical Reviews*. **2010**. V. 110. P. 4949.
- 4 Hosseini M. W., Asfari Z., Vicens J. Eds. // *Thia-, Mercapto-, and Thiamercapto-calix[4]arenes. Calixarenes 2001*. Dordrecht: Kluwer Academic, **2001**. P. 110.
- 5 Фрайфелдер Д. // *Физическая биохимия. Применение физико-химических методов исследования в биохимии и молекулярной биологии*. Москва: Изд-во «Мир», **1980**. 582 с.
- 6 Лакович Дж. *Основы флуоресцентной спектроскопии*. Москва: Мир. **1986**. 496 с.
- 7 Баранов В.С. // *Соросовский образовательный журнал*. **1999**. №3. С. 4.